Копия верна

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«22» декабря 2020 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса человека 6 типа в сыворотке (плазме) крови

(HHV-6-IgG-ИФА-БЕСТ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса человека 6 типа в сыворотке (плазме) крови «HHV-6-IgG-ИФА-БЕСТ» (далее по тексту – набор) предназначен для качественного выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к вирусу герпеса человека 6 типа (HHV-6) в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).

Набор может быть использован при диагностике заболеваний, вызываемых HHV-6, например, внезапная экзантема, инфекционный мононуклеоз, не обусловленный вирусом Эпштейна-Барр, рассеянный склероз, менингит.

1.2. Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контрольные образцы. Возможно дробное использование набора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения IgG к вирусу герпеса человека 6 типа (HHV-6) основан на двухстадийном «непрямом» варианте твердофазного иммуноферментного анализа. На первой стадии анализа содержащиеся в исследуемых образцах специфические антитела к HHV-6 связываются с иммобилизованным на поверхности лунок планшета рекомбинантным антигеном HHV-6. На второй стадии конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена взаимодействует с комплексами «антиген-IgG». При инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках, содержащих образовавшиеся комплексы

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым, нач. лаборатории герпес-вирусных инфекций М.П. Кандрушиной и ведущим биотехнологом лаборатории герпес-вирусных инфекций И.В. Аборневой.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

«антиген-IgG-конъюгат». Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации IgG к HHV-6 в анализируемых образцах. Реакцию останавливают стоп-реагентом и измеряют оптическую плотность (ОП) в лунках планшета.

2.2. Состав набора

Компонент набора (сокращение) *Описание*	Кол-во
Планшет разборный с иммобилизованными рекомбинантным антигеном HHV-6	1 шт.
Положительный контрольный образец ($К^+$) *Содержит IgG к HHV-6.* *Содержит натрия азид (0,1%), натрия мертиолят (0,02%).*	1 фл., 1,5 мл
Отрицательный контрольный образец ($К^-$) *Не содержит IgG к HHV-6.* *Содержит натрия азид (0,2%), ProClin 300 (0,02%)*	1 фл., 3,0 мл
Конъюгат *Конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена.* *Содержит ProClin 150 (0,0044%), фенол (0,008%), ProClin 300 (0,03%).*	1 фл., 13,0 мл
Раствор для разведения сывороток (РРС) *Содержит натрия азид (0,1%), ProClin 300 (0,02%).*	1 фл., 12,0 мл
Раствор для предварительного разведения сывороток (РПРС) *Содержит ProClin 300 (0,02%).*	1 фл., 10,0 мл
Концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) *Содержит ProClin 300 (0,25 %).*	2 фл. по 28,0 мл
Раствор тетраметилбензидина (раствор ТМБ) *Содержит 3,3',5,5' - тетраметилбензидин (0,025%).*	1 фл., 13,0 мл
Стоп-реагент *Содержит кислоту серную (4,9%).*	1 фл., 12,0 мл
Планшет разборный для предварительного разведения исследуемых образцов	1 шт.
Пленки для заклеивания планшета	2 шт.
Наконечники для дозаторов на 2-200 мкл	16 шт.
Ванночки для реагентов	2 шт.

3. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая чувствительность: клинические исследования, проведенные на 94 положительных клинических образцах, показали 100% чувствительность (интервал 97%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.2. Диагностическая специфичность: клинические исследования, проведенные на 82 отрицательном клиническом образце, показали 100% специфичность (интервал 96%-100%, с доверительной вероятностью 90%).

3.3. Аналитическая специфичность:

При исследовании 59 клинических образцов перекрестных реакций, обусловленных наличием общих антигенных детерминант у вируса герпеса человека 6 типа и возбудителей других герпес-вирусных инфекций (цитомегаловирус, вирус простого герпеса 1 и 2 типа,

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Эпштейна-Барр, Варицелла Зостер (ветряной оспы), герпеса человека 8 типа) не выявлено.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Набор предназначен для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике обученным персоналом. Требования безопасности к медицинским лабораториям приведены в ГОСТ Р 52905-2007.

4.3. Стоп-реагент и раствор ТМБ обладают раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента и раствора ТМБ на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды. Некоторые компоненты содержат ProClin 300, ProClin 150, фенол, кислоту серную, натрия азид, натрия мертиолят, тетраметилбензидин в концентрациях, указанных в п. 2.2. «Состав набора».

Все компоненты набора, содержащие в своем составе материалы человеческого происхождения, инактивированы.

4.4. При работе с исследуемыми и контрольными образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г.

4.5. При использовании набора образуются отходы классов А, Б и Г, которые классифицируются и уничтожаются (утилизируются) в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.6. Дезинфекцию наборов реагентов, посуды и материалов, контактировавших с исследуемыми и контрольными образцами, следует проводить по МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– Спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм; допускается измерение при одной длине волны – 450 нм;

– термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;

– промывочное устройство для планшетов;

– холодильник бытовой;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

– дозаторы одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 10 – 5000 мкл;

– дозаторы многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкостей 10 – 300 мкл;

– цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

– перчатки медицинские диагностические одноразовые;

– бумага фильтровальная лабораторная;

– дезинфицирующие средства.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Требования к условиям и процедурам ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований с целью исключения или ограничения влияния эндогенных, экзогенных, ятрогенных и иных факторов, мешающих правильному отражению состояния внутренней среды обследуемых пациентов в результатах клинических лабораторных исследований изложены в ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа».

Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала осуществляется согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории», утвержденным Роспотребнадзором и Рекомендациям «Организация преаналитического этапа при централизации лабораторных исследований», одобренным профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 30.05.2013.

6.2. Для проведения анализа использовать образцы сыворотки крови человека или образцы плазмы крови, полученной с использованием в качестве антикоагулянта цитрата натрия или ЭДТА.

6.3. Образцы сыворотки (плазмы) крови следует хранить при температуре (2-8) °С не более 5 суток, или при температуре минус 18 °С и ниже, если требуется более длительное хранение. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

6.4. Образцы сыворотки или плазмы крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием.

6.5. Образцы, содержащие гемоглобин в концентрации до 2 мг/мл, билирубин в концентрации до 0,2 мг/мл, триглицериды в концентрации до 20 мг/мл, пригодны для использования.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. ***Внимание! Тщательное соблюдение описанных ниже требований позволит избежать искажения результатов ИФА.***

– Перед постановкой реакции все компоненты набора необходимо выдержать при температуре (18-26) °С не менее 30 мин.

– При дробном использовании набора после отбора необходимого количества компонентов флаконы с растворами необходимо плотно закрыть, а оставшиеся стрипы сразу упаковать в пакет с влагопоглотителем, удалить из него воздух и плотно закрыть замок. Хранить при температуре (2–8) °С, использовать в течение всего срока годности набора. Допускается хранение ФСБ-Т×25 и стоп-реагента при температуре (2–30) °С.

–Необходимо избегать воздействие прямого солнечного света на раствор ТМБ при подготовке и проведении ИФА.

–При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, раствор ТМБ, РПРС, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы в наборах АО «Вектор-Бест».

–Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-производителей.

–Для приготовления растворов и проведении ИФА следует использовать одноразовые наконечники для дозаторов.

–При использовании автоматического устройства для промывки планшетов необходимо следить за чистотой ёмкости для промывочного раствора и соединительных шлангов: в них не должно быть микробной контаминации. Для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно следует выполнить процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой. Один раз в неделю необходимо производить замачивание всей системы промывочного устройства в 70% спирте или в другом растворе, рекомендованном инструкцией к прибору.

–Для дезинфекции посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, рекомендуем использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, не содержащие активный кислород и хлор, например, комбинированные средства на основе ЧАС (четвертичных аммониевых соединений), спиртов, третичных аминов.

–В случае повторного использования посуду (ванночки) для конъюгата необходимо промыть проточной водой и тщательно ополоснуть дистиллированной водой; посуду (ванночки) для раствора ТМБ ополоснуть водой, промыть 70% этиловым спиртом и тщательно от-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

мыть дистиллированной водой. Нельзя обрабатывать посуду (ванночки) дезинфицирующими растворами и моющими средствами.

–Дозаторы и рабочие поверхности обрабатывать только 70% раствором этилового спирта. Не использовать перекись водорода, хлорамин.

–Запрещается повторное использование планшета разборного для предварительного разведения исследуемых образцов.

7.2. Подготовка планшета.

Вскрыть пакет с планшетом выше замка. Оставить на рамке необходимое для проведения анализа количество стрипов.

7.3. Приготовление промывочного раствора.

Перемешать содержимое флакона с ФСБ-Т×25. При выпадении в концентрате осадка солей прогреть его при температуре (30-40) °С до полного растворения осадка.

В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество концентрата ФСБ-Т×25 и довести до соответствующего объема дистиллированной водой, тщательно перемешать.

Хранение: при температуре (2-8) °С не более 1 месяца или при (18-26) °С не более 7 суток.

7.4. Конъюгат.

Конъюгат готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в ванночку для реагента необходимое количество конъюгата.

7.5. Раствор ТМБ.

Раствор ТМБ готов к использованию. В соответствии с числом используемых стрипов (см. таблицу расхода компонентов) отобрать необходимое количество раствора ТМБ в ванночку для реагента.

7.6. Подготовка исследуемых образцов.

Исследуемые образцы развести в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток (РПРС). Для этого внести в лунки планшета для предварительного разведения исследуемых образцов по 90 мкл РПРС и добавить по 10 мкл цельных образцов сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать.

При разведении сыворотки красный цвет РПРС должен измениться на желтый. Если изменения цвета не произошло, анализ образца сыворотки может дать неправильный результат. При разведении плазмы цвет раствора в лунке меняется незначительно.

Хранение: 10-кратно разведенные образцы хранить не более 3 ч при температуре (18-26)°С.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица расхода компонентов

Количество используемых стрипов	Промывочный раствор		Конъюгат, мл	Раствор ТМБ, мл
	ФСБ-Т×25, мл	Дистиллированная вода, мл		
1	2,0	до 50	1,0	1,0
2	4,0	до 100	2,0	2,0
3	6,0	до 150	3,0	3,0
4	8,0	до 200	4,0	4,0
5	10,0	до 250	5,0	5,0
6	12,0	до 300	6,0	6,0
7	14,0	до 350	7,0	7,0
8	16,0	до 400	8,0	8,0
9	18,0	до 450	9,0	9,0
10	20,0	до 500	10,0	10,0
11	22,0	до 550	11,0	11,0
12	24,0	до 600	12,0	12,0

7.7. Контрольные образцы ($К^+$, $К^-$) и стоп-реагент готовы к использованию.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Внимание! Раствор для разведения сывороток перед использованием встряхнуть!

8.1. В любые две лунки, например, А-1 и В-1, внести по 100 мкл отрицательного контрольного образца ($К^-$), в одну лунку, например, С-1, – 100 мкл положительного контрольного образца ($К^+$).

В остальные лунки внести по 90 мкл РРС и по 10 мкл предварительно разведенных исследуемых образцов (п. 7.6.), тщательно перемешать. Таким образом, исследуемый образец разбавляется в 100 раз.

8.1.1. Для определения титра антител в выявленных положительных образцах в лунки верхнего ряда А-2 – А-12 внести по 180 мкл РРС и по 20 мкл предварительно разведённых исследуемых образцов, тщательно перемешать пипетированием. В лунки рядов В-Н внести по 100 мкл РРС. Многоканальной пипеткой перенести по 100 мкл разведённых исследуемых образцов сыворотки (плазмы) из лунок верхнего ряда в лунки второго ряда, перемешать (контрольные образцы не титровать). Из лунок второго ряда – в лунки третьего ряда, перемешать. Так же последовательно перенести до последнего ряда. Из последнего ряда удалить в сосуд с дезинфицирующим раствором по 100 мкл содержимого лунок. Таким образом, в вертикальных рядах получаются последовательные 2-кратные разведения исследуемых образцов в интервале от 1:100 до 1:12800.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Время внесения образцов не должно превышать 10 минут.

Стрипы заклеить пленкой и инкубировать 30 мин в термостате при температуре (37±1) °С.

8.2. По окончании инкубации снять липкую пленку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть лунки планшета 5 раз промывочным раствором (п. 7.3.), чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить 400 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 30 сек. Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

8.3. Внести во все лунки по 100 мкл конъюгата (см. п. 7.4.), заклеить стрипы пленкой и инкубировать 30 мин в термостате при температуре (37±1) °С.

Остатки конъюгата из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным конъюгатом).***

8.4. По окончании второй инкубации промыть лунки стрипов, как указано в п. 8.2.

8.5. Во все лунки планшета внести по 100 мкл раствора ТМБ (см. п. 7.5.) и инкубировать в защищённом от прямого солнечного света месте 25 мин при температуре (18-26) °С.

Остатки раствора ТМБ из ванночки утилизировать ***(не сливать во флакон с исходным раствором ТМБ).***

8.6. Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента.

8.7. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках на спектрофотометре в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 - 655 нм. Допускается измерение при одной длине волны - 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 5 мин.

9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Рассчитать среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках с отрицательным контрольным образцом ($ОП_{ср.}К^-$).

9.2. Результаты исследований учитывать только при соблюдении следующих условий:

– среднее значение ОП в лунках с $К^-$ не более 0,25;

– значение ОП в лунке с $К^+$ не менее 1,0.

9.3. Вычислить критическое значение оптической плотности ($ОП_{крит.}$) по формуле:

$$ОП_{крит.} = ОП_{ср.}К^- + 0,3.$$

9.4. Результат анализа считается положительным, если $ОП_{обр.} > ОП_{крит.}$.

Результат анализа считается отрицательным, если $ОП_{обр.} < 0,8 \times ОП_{крит.}$.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Результат анализа считается неопределенным, если $0{,}8 \times ОП_{крит.} \leq ОП_{обр.} \leq ОП_{крит.}$,

где: $ОП_{обр.}$ – значение оптической плотности в лунке с исследуемым образцом.

При определении титра в выявленных положительных образцах за титр IgG к HHV-6 принимается последнее разведение исследуемого образца, при котором значение ОП в соответствующей лунке больше $ОП_{крит.}$

В случае неопределенного результата рекомендуется повторно исследовать эти образцы параллельно с образцами данных пациентов, взятыми через 5–14 дней.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

10.1. Транспортировать изделия следует транспортом всех видов в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозок, действующими на транспорте данного вида, при температуре (2-8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 26 °С не более 10 суток.

10.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно осуществляться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности в холодильных камерах или холодильниках, обеспечивающих регламентированный температурный режим с ежедневной регистрацией температуры.

10.3. Срок годности набора реагентов – 12 месяцев со дня выпуска. Не допускается применение наборов по истечении срока их годности.

10.4. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.5. Набор предназначен для однократного применения.

11. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

11.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

11.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

11.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

По вопросам, касающимся качества набора «HHV-6-IgG-ИФА-БЕСТ», следует обращаться в **АО «Вектор-Бест»** по адресу:

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, а/я 121,

тел. (383) 227-67-64, (383) 363-57-95.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Ведущий биотехнолог лаборатории
герпес-вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест» И.В. Аборнева

Нач. лаборатории
герпес-вирусных инфекций НИИ СД
АО «Вектор-Бест» М.П. Кандрушина

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест» М.Ю. Рукавишников

«СОГЛАСОВАНО»
Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России Т.И. Поспелова
м.п.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 10 листов.
Отв. за учет договоров НИР ФГБОУ ВО НГМУ
Минздрава России
_____ Захарова Л.Н
"22" 12 2020 г.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru